AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 69, №2, səh. 5-13 (2014)

Quraqlıq Stresinin Təsirinə Məruz Qalmış Arpa Genotiplərinin (*Hordeum vulgare* L.) Yarpaqlarında Antioksidant Fermentlərin Fəallığının və İzoenzim Tərkibinin Tədqiqi

İ.M. Hüseynova[1*], M.Y. Nəsrullayeva[2], S.M. Rüstəmova[1], D.R. Əliyeva[1], C.Ə. Əliyev[1]

[1] *AMEA Botanika İnstitutu, Badamdar şossesi, 40, Bakı AZ 1073, Azərbaycan;*
[2] *AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutu, Azadlıq prospekti, 155, Bakı AZ 1106, Azərbaycan;*
**E-mail: huseynova-i@botany-az.org*

Quraqlıq bütün dünyada bitkilərin məhsuldarlığını və dənin keyfiyyətini aşağı salan əsas stres amillərindən biridir. Arpa bitkisi zəngin genetik müxtəlifliyə malik olub ətraf mühitin əlverişsiz amillərinə qarşı kontrast genotiplərin cavab reaksiyalarını qiymətləndirmək üçün mühüm mənbədir. Antioksidant metabolizm bitkilərin quraqlığa cavab reaksiyalarında əhəmiyyətli rol oynaya bilir. Tədqim olunan işin məqsədi quraqlıq stresi zamanı antioksidant fermentlər səviyyəsində aşkar olunan fərqlər əsasında arpa genotiplərinin quraqlığa davamlılıq variasiyalarının müəyyən edilməsi olmuşdur. Torpaq quraqlığına məruz qalmış 4 arpa genotipinin yarpaqlarında katalaza (KAT), askorbatperoksidaza (APO), qlütation-reduktaza (QR) və superoksiddismutaza (SOD) fermentlərinin fəallıqları və izoenzim tərkibləri öyrənilmişdir. Quraqlığa məruz qalmış bitkilərdə KAT və SOD-un fəallıqları artmış, APO-nun fəallığı isə azalmışdır. Kəskin quraqlıq şəraitində QR-in ümumi fəallığı K 2778 və St. Qarabağ 7 genotiplərində artmış, yerli №77 və St.Pallidum 596 genotiplərində isə azalmışdır. Normal suvarma şəraitində becərilən nümunələrlə müqayisədə stres zamanı fermentlərin izoenzim tərkibində əsaslı fərqlər (yeni izoformaların əmələ gəlməsi və yaxud itməsi) müşahidə edilməmiş, lakin elektroforetik spektrlərdə uyğun izoformaların intensivliyi artmışdır.

Açar sözlər: *Hordeum vulgare L., quraqlıq stresi, oksigenin aktiv formaları, antioksidant fermentlər, izoenzim tərkibi*

GİRİŞ

Digər dənli bitkilərlə müqayisədə, arpa dən və samanının keyfiyyəti baxımından yem bitkisi kimi daha dəyərlidir. Bütün dünyada kənd təsərrüfatı bitkilərinin məhsuldarlığını və dənin keyfiyyətini aşağı salan əsas stres amillərindən biri quraqlıqdır (Aranjuelo et al., 2011; Li et al., 2013). İqlim dəyişiklikləri üzrə fəaliyyət göstərən müxtəlif Dövlətlərarası Qrupların ekspertləri tərəfindən irəli sürülən proqnozlara əsasən, gələcəkdə yağıntıların daha da azalması və nəticədə evapotranspirasiya proseslərinin güclənməsi gözlənilir (Solomon et al., 2007). Məlumdur ki, bitki orqanizmində su qıtlığı kimi stres amilin təsirindən baş verən oksidləşdirici proseslər nəticəsində oksigenin fəal formaları (OFF) olan superoksid ($O_2^{\bullet}$), hidrogen peroksid (H_2O_2), hidroksil radikalları ($OH^{\bullet}$) və atomar oksigenin ($^1O_2$) miqdarı sürətlə artır (Faize et al., 2011). Hüceyrədə OFF ilə antioksidant fermentlər arasında mövcud balansın pozulması bir sıra oksidləşdirici zədələnmələrin əmələ gəlməsinə zəmin yaradır. OFF olduqca yüksək aktivliyə malikdir və onların artıq miqdarı membran lipidləri, zülallar və nuklein turşularına əhəmiyyətli dərəcədə təsir göstərərək ciddi zədələnmələrə gətirib çıxarır (Apel and Hirt, 2004). Bitkilər OFF-larının zədələyici təsirini aradan qaldıra biləcək güclü antioksidant sistemə malikdirlər (Joseph and Jini, 2011). Bitki orqanizmində yaranan OFF-ların toksiki təsirinə qarşı fəaliyyət göstərən fermentativ (superoksiddismutaza, katalaza, askorbat-peroksidaza, qlütationreduktaza və s.) və qeyri-fermentativ (askorbin turşusu, tokoferol, qlutation, fenol birləşmələri və s.) antioksidant sistemlər mövcuddur. Bir qayda olaraq, hər hüceyrə kompartmenti konkret OFF-ni zərərsizləşdirə bilən bir və ya bir neçə fermentativ fəallığa malikdir. Antioksidant fermentlər praktiki olaraq hüceyrənin bütün kompartmentlərində OFF-ini detoksikasiya edərək, bitkinin müdafiə sistemində əhəmiyyətli rol oynayır (Mittler, 2002; Ahmad et al., 2010).

Son on il ərzində bitki orqanizminin oksidləşdirici stresə qarşı cavab reaksiyalarının molekulyar-genetik mexanizmləri daha dərin şəkildə öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, bitkilərdə 150-dən artıq gen OFF-in detoksikasiyasında iştirak edən fermentlərin sintezini kodlaşdıraraq yüksək təşkil olunmuş OFF gen şəbəkəsini əmələ gətirir (Mittler et al., 2004). Bitkilərin antioksidant müdafiə sistemlərini kodlaşdıran bəzi genlər artıq klonlaşdırılaraq, transgen xətlərin alınmasında istifadə olunur (Sarovar et al., 2005). Ətraf mühitin əlverişsiz stres amillərinə qarşı yüksək davamlılığın əldə olunma-

sında hüceyrədə əsas funksiyalara cavabdeh olan, yəni hüceyrə komponentlərinin quruluşunu saxlaya bilən genlərlə aparılan manipulyasiyalar böyük əhəmiyyət kəsb edir.

Bu istiqamətdə müasir ədəbiyyat məlumatlarının təhlili göstərmişdir ki, stres amillərinə qarşı ümumi cavab reaksiyası mövcud deyildir (Fayez and Bazaid, 2014; Amini, 2013; Faize et al., 2011; Ashraf, 2010). Antioksidant sistemin eyni bir stres amilinə qarşı cavab reaksiyası bitkinin növündən, onun yaşı və becərilmə şəraitindən asılıdır (Polesskaya, 2007). Eyni zamanda antioksidant sistemin cavab reaksiyası stresin müddəti ilə də müəyyən edilir (Aranjuelo et al., 2011; Ashraf, 2010; Fu and Huang, 2001). Antioksidant sistemin oksidləşdirici stresə qarşı cavab reaksiyası bitkinin fizioloji vəziyyəti ilə determinə olunan fermentlərin fəallığından da asılıdır (Shao et al., 2005).

Yuxarıda qeyd olunanları nəzərə alaraq, təqdim olunan işin əsas məqsədi torpaqda su qıtlığı şəraitində yetişdirilən müxtəlif arpa genotiplərində antioksidant fermentlərdən katalaza, askorbat peroksidaza, qlütation reduktaza və superoksiddismutazanın fəallıqlarının və izoferment tərkibinin tədqiqi olmuşdur.

MATERİAL VƏ METODLAR

Tədqiqat obyekti kimi, *Nutans* növ müxtəlifliyinə aid St.Qarabağ-7 və № 77 yerli, *Pallidum* növ müxtəlifliyinə aid Pallidum-596 və K-2778 genotipləri götürülmüşdür. Bitkilər Azərbaycan Elmi-Tədqiqat Əkinçilik İnstitutunun Cəlilabad Bölgə Təcrübə Stansiyasında normal suvarma və su qıtlığı şəraitində becərilmişdir.

Katalaza fermentinin fəallığının təyini

Katalazanın (KAT) fəallığının təyini üçün 1 q yarpaq toxuması 10 ml 50 mM kalium-fosfat buferində (pH 7.0) əzilmişdir. Homogenat filtrasiya edilmiş və 10 dəqiqə ərzində 8000 g-də sentrifuqalaşdırılmışdır. 2,9 ml fosfat buferinin (pH 7,0) üzərinə 25 mkl alınmış ferment ekstraktı tökülmüşdür. Ölçmədən qabaq bu məhlula 90 mkl 3 %-li H_2O_2 əlavə edilmişdir. Spektrofotometrdə 1 dəqiqə ərzində 240 nm dalğa uzunluğunda optik sıxlığın düşməsi ölçülmüşdür. Fermentin fəallığı molyar ekstinksiya əmsalı ε=39,4 $mM^{-1}sm^{-1}$ əsasında mmol/(q·dəq) vahidində hesablanmışdır (Kumar and Knowles, 1993).

Askorbatperoksidaza fermentinin fəallığının təyini

Askorbatperoksidazanın (APO) fəallığını təyin etmək üçün 1 q yarpaq götürülmüş və soyuqda 10 ml 50 mM kalium-fosfat buferində (pH 7,6) əzilmişdir. 0,3 q PVP əlavə edildikdən sonra süzülmüş və 10 dəqiqə ərzində 12000 g-də sentrifuqalaşdırılmışdır. Reaksiya qarışığının tərkibində 50 mkM 0,1 mM H_2O_2, 2,55 ml 50 mM fosfat buferi (pH 7,6) və homogenatı sentrifuqalaşdırdıqdan sonra alınan bitki ekstraktından 300 mkl götürülmüşdür. Optik sıxlıq ULTROSPEC 3300 PRO ("AMERSHAM", ABŞ) spektrofotometrində, nəzarət kimi fermentsiz ekstrakt götürülərək 290 nm dalğa uzunluğunda ölçülmüşdür. APO-nun fəallıq ölçüsü kimi reaksiyanın ilk 30 saniyəsində optik sıxlığın düşməsi götürülmüş və molyar ekstinksiya əmsalı kimi ε=2,8 $mM^{-1}sm^{-1}$ nəzərə alınaraq, mmol/q·dəq vahidində hesablanmışdır (Nakano and Asada, 1981).

Qlütation reduktaza fermentinin fəallığının təyini

Qlütation reduktazanın (QR) fəallığı spektrofotometrik üsulla 340 nm dalğa uzunluğunda oksidləşmiş qlütationun iştirakı ilə NADFH-ın oksidləşməsi əsasında müəyyən edilmişdir (Yannarelli, 2007). Reaksiya mühitində 100 mM fosfat buferi (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,2 mM NADF H və 0,5 mM oksidləşmiş qlütation olur. Optik sıxlıq 10 dəqiqə müddətində ölçülmüşdür. Fermentin aktivliyi mkmol/(mq dəq) ilə ölçülür, əsas molyar ekstinksiya əmsalı ε=6,2 $mM^{-1}sm^{-1}$ götürülmüşdür (Yannarelli, 2007).

Superoksiddismutaza fermentinin fəallığının təyini

Superoksiddismutazanın (SOD) fəallığını təyin etmək üçün spesifik kitdən (SOD Assay Kit-WST, Sigma-Aldrich) istifadə olunmuşdur. Bitki hüceyrələrində SOD-un bir neçə izoforması mövcuddur. Fermentin sitozol forması tədqiq edilmişdir. Çəkilmiş yarpaqlar 50 mM kalium-fosfat buferində (pH 7,8) homogenləşdirilmişdir. Homogenat sentrifuqalaşdırılmış, supernatantdan SOD-un sitozol formasını özündə saxlayan qarışıq kimi istifadə olunmuşdur. Optik sıxlıq 450 nm dalğa uzunluğunda təyin edilmişdir .

Zülalların miqdarının təyini

Zülalların miqdarı Sedmak metoduna əsaslanaraq, Kumasi-G250 rəngləyicisindən və qliserindən istifadə etməklə (1:1) təyin edilmişdir (Sedmak and Grossberg, 1977).

Fermentlərinin keyfiyyət tərkibinin elektroforetik təyini

Askorbatperoksidaza və katalazanın aktivliklərinin keyfiyyət dəyişkənliyi Lemmli metoduna əsasən (Laemmli, 1970) nativ poliakrilamid gel

(PAAG) elektroforez üsulu ilə öyrənilmişdir. Zülalların miqdarı Sedmak metoduna əsasən (Sedmak and Grossberg, 1977) müəyyən olunmuş, standart zülal kimi öküzün zərdab albumininndən istifadə edilmişdir. Elektroforez 0,75 mm qalınlığa, 8 sm hündürlüyə malik 7%-li (KAT üçün) və 10%-li (APO üçün) PAAG-də Tris-HCl buferində (pH 8,3) 3 saat 4°C temperaturda 30 mA sabit cərəyanda SE 250 ("Amersham Biosciences", ABŞ) cihazında aparılmışdır.

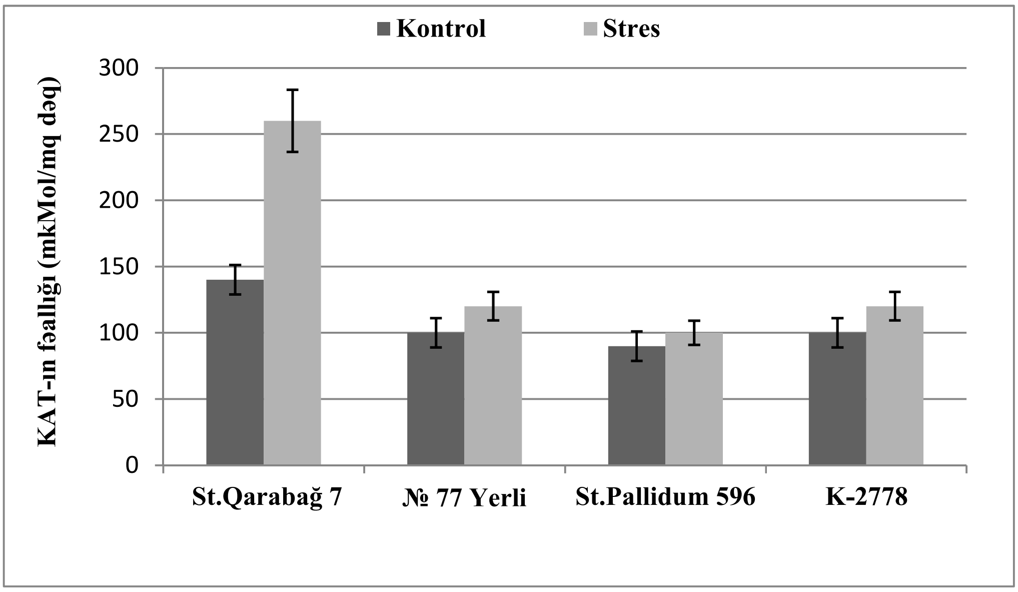
Askorbatperoksidazanın izoenzim tərkibi Mittler və Zilinskas metoduna əsasən (Mittler and Zilinskas, 1993) təyin edilmiş, elektrod buferinə 2 mM natrium askorbat əlavə edilmişdir. Elektroforezdən sonra gel tərkibində 2 mM Na-askorbat olan 50 mM kalium fosfat buferində (pH 7,0) 30 dəqiqə inkubasiya olunur. Bundan sonra gel 20 dəqiqə tərkibində 4 mM Na-askorbat və 2 mM H_2O_2 olan 50 mM kalium fosfat buferində (pH 7,0) saxlanılmış, daha sonra tərkibində 28 mM TEMED və 2,45 mM nitro tetrazolium mavisi olan 50 mM kalium fosfat buferində (pH 7,8) ag fonda mavi xəttlər görünənə qədər inkubasiya olunmuşdur.

Katalazanın izoenzim tərkibini təyin etmək üçün gel 1% $K_3[Fe(CN)_6]$, 1% $FeCl_3$ və 3,27 mM H_2O_2 məhlulunda 20 dəqiqə qaranlıqda saxlandıqdan sonra işığa keçirilir və tünd göy fonda sarı xəttlər görünənə qədər inkubasiya olunmuşdur (Woodbury et al., 1971).

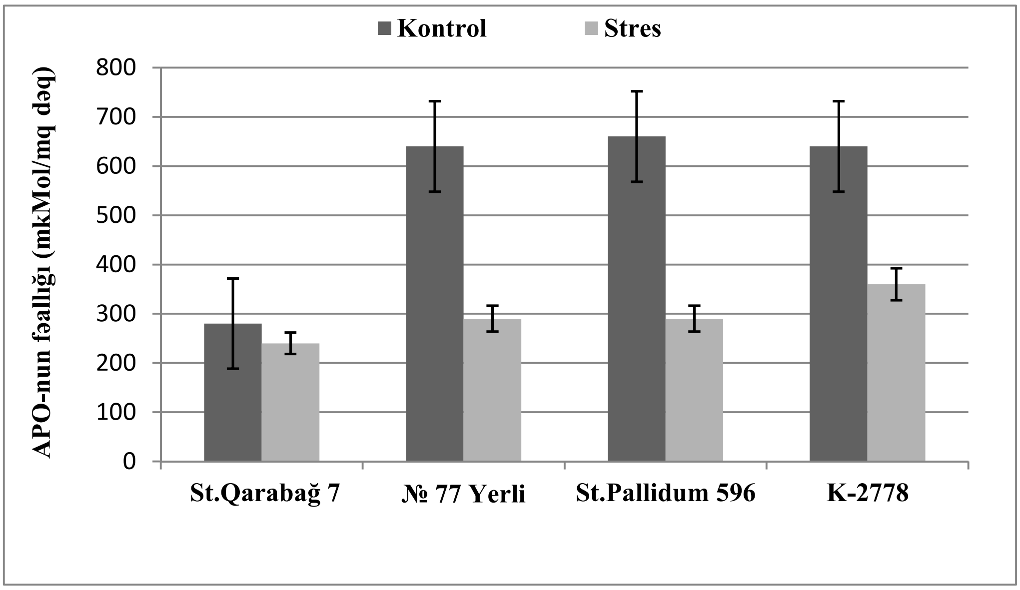
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Normal suvarma və quraqlıq şəraitlərində becərilən arpa genotiplərinin antioksidant sisteminin fəallığında əhəmiyyətli fərqlər müşahidə edilmişdir. Bitkilərin oksidləşdirici stresə qarşı müdafiə sistemində əsas rol oynayan antioksidant fermentlərdən biri katalazadır. Bu ferment hidrogen peroksidin sürətli utilizasiyasını təmin edir (Mhamdi et al., 2010). Buna görə də normal suvarma və quraqlıq stresi zamanı Nutans növ müxtəlifliyinə aid St.Qarabağ-7 və № 77 Yerli və Pallidum növ müxtəlifliyinə aid St.Pallidum 596 və K-2778 genotiplərində katalaza fermentinin fəallığı təyin edilmişdir (Şəkil 1). Normal suvarılan bitkilərdə katalazanın fəallığında əhəmiyyətli fərqlər müşahidə edilməmişdir. St.Qarabağ-7 genotipində digər genotiplərlə müqayisədə katalazanın fəallığı bir qədər yüksək (140±12 mkMol/mq.dəq), Pallidum-596 genotipində isə nisbətən aşağı olmuşdur (90±10 mkMol/mq·dəq). № 77 Yerli və K-2778 genotiplərində normal suvarma zamanı katalazanın fəallığı demək olar ki, eyni qiymətə malik olmuşdur.

Quraqlıq stresinin təsirinə məruz qalmış bütün genotiplərdə KAT-ın fəallığı yüksək olmuşdur. St.Qarabağ-7 genotipində normal suvarılan bitkilərlə müqayisədə su qıtlığı zamanı katalazanın fəallığı 2 dəfəyədək artmış və 260±24 mkMol/mq.dəq təşkil etmişdir. № 77 Yerli və K-2778 genotiplərində normal suvarma zamanı olduğu kimi, quraqlığın təsirindən katalazanın fəallığı, demək olar ki, eyni səviyyədə yüksəlmişdir. Pallidum-596 genotipində su qıtlığı zamanı KAT-ın fəallığı nisbətən az artmış və 100±12 mkMol/mq·dəq təşkil etmişdir. Quraqlıq zamanı katalazanın yüksək fəallığı onun stresə qarşı müdafiə funksiyası rolunu göstərir. Katalaza fermenti xromoproteidlərə aid olub, prostetik qrup (qeyri-zülal) kimi oksidləşmiş hem saxlayır. Mübadilə reaksiyaları zamanı əmələ gələn hidrogen-peroksid müəyyən qatılıqlarda hüceyrə üçün toksiki təsir göstərir. Katalaza fermenti hidrogen-peroksidi zərərsizləşdirərək, onu suya və qeyri-aktiv molekulyar oksigenə çevirir (Mittler, 2002).



Şəkil 1. Torpaq quraqlığı zamanı müxtəlif arpa genotiplərində katalaza fermentinin fəallığı.



Şəkil 2. Torpaq quraqlığı zamanı müxtəlif arpa genotiplərində askorbatperoksidaza fermentinin fəallığı.

Canlı hüceyrələrdə katalaza fermenti ilə yanaşı, hidrogen-peroksidi zərərsizləşdirən peroksidaza fermenti də vardır. Lakin sübut olunmuşdur ki, katalaza öz katalitik funksiyasını peroksidazadan asılı olmayaraq yerinə yetirir. Peroksidlərin aşağı səviyyələrində öz funksiyasını yerinə yetirən peroksidazalardan fərqli olaraq, katalaza peroksidlərin yüksək qatılıqlarında da effektiv təsir göstərir.

Bitkilərin oksidləşdirici stresdən müdafiəsində askorbatperoksidaza fermenti də mühüm rol oynayır (Najami et al., 2008; Sarvajeet and Narendra, 2010). APO bitki hüceyrələrində xloroplastda və sitozolda hidrogen peroksidin utilizasiyasında açar ferment rolunu oynayır. Arpa genotiplərində askorbatperoksidaza fermentinin də fəallığı normal suvarma və quraqlıq şəraitində analiz edilmişdir (Şəkil 2). Normal suvarılma zamanı St.Qarabağ-7 genotipi katalaza fermentinin maksimal fəallığı ilə xarakterizə olunduğu halda, askorbatperoksidaza fermenti isə əksinə, digər genotiplərlə müqayisədə minimal fəallıq göstərir (280±22 mkMol/ mq·dəq). Ayrı-ayrı növmüxtəlifliklərinə aid olmalarına baxmayaraq, arpanın № 77 Yerli və K-2778 genotiplərində askorbatperoksidaza fermentinin fəallığı, demək olar ki, eynidir və uyğun olaraq № 77 Yerli üçün - 640±52 mkMol/mq·dəq, K-2778 genotipi üçün isə - 640±66 mkMol/mq·dəq təşkil edir. Maraqlıdır ki, katalaza fermentinin də fəallığı bu genotiplərdə eyni qiymətə malikdir. Arpanın St.Pallidum 596 genotipində normal suvarma zamanı askorbatperoksidaza fermentinin maksimal fəallığı müşahidə edildiyi halda (660±56 mkMol/mq·dəq), KAT bu genotipdə minimal fəallıq götərmişdir.

Quraqlığın arpa genotiplərində askorbatperoksidaza fermentinin fəallığına təsiri şəkil 2-də göstərilmişdir. Şəkildən göründüyü kimi, katalaza fermentindən fərqli olaraq, bütün genotiplərdə su qıtlığının təsirindən askorbatperoksidazanın fəallığı aşağı düşmüşdür. Bu zaman fermentin minimal fəallığı №St. Qarabağ-7 genotipində (240±21 mkMol/ mq·dəq), maksimal fəallıq isə K-2778 genotipində (360±33 mkMol/mq·dəq) müşahidə edilmişdir. Su qıtlığı şəraitində askorbat-peroksidaza fermentinin maksimal fəallığı ilə xarakterizə olunan K-2778 genotipində kontrola nəzərən fermentin fəallığı, təxminən 2 dəfəyə qədər aşağı düşür. Stres zamanı arpanın № 77 Yerli və St.Pallidum-596 genotiplərində askorbatperoksidaza fermentinin fəallığı eyni olmuşdur.

APO askorbatın oksidləşməsini kataliz edir və monodehidroaskorbat (MDA) radikalının meydana gəlməsinə gətirib çıxarır. APO-nun hüceyrə daxilində kompartmentləşməsinə görə 4 müxtəlif forması ayırd edilir: xloroplastlarda stromada həll olmuş forma (sAPX), xloroplastlarda tilakoidlə birləşmiş forma (tAPX), sitozol forma (cAPX) və qlioksisomal membran forma (gmAPX). Quraqlıq və istilik stresi zamanı APO-nun fəallığnın dəyişməsi müxtəlif müəlliflər tərəfindən qeyd olunmuşdur (Badiani et al., 1990). Eyni zamanda hidrogen peroksidin APO-nun sitozol fraksiyasının genini induksiyalaşdıraraq oksidləşdirici stresin təsiri zamanı siqnalların ötürülməsində iştirakı da məlumdur (Yoshimura et al., 2000).

Qlütationreduktaza bitkilərin antioksidant sisteminin müdafiəsində vacib ferment hesab edilir. O, qlutation-askorbat tsiklində $NADFH^{+}$-ın iştirakı ilə oksidləşmiş qlutationun bərpasını kataliz edir (Saruhan et al., 2009). Tədqiqat zamanı qlütationreduktaza fermentinin fəallığı da ölçülmüşdür (Şəkil 3). Normal suvarılan bitkilər arasında № 77

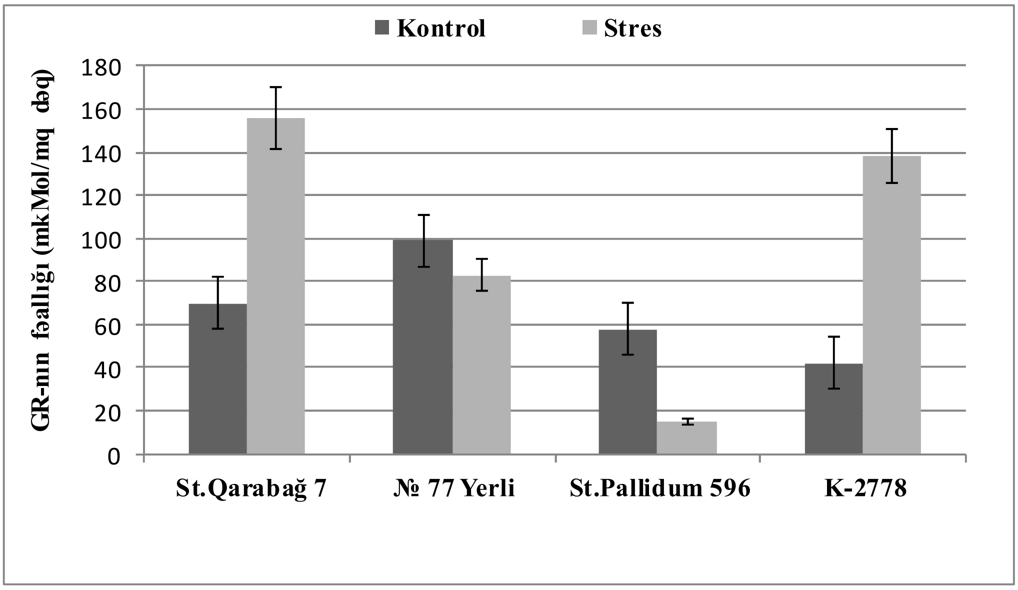
genotipi QR-nın maksimal fəllığı (99±10 mkMol/mq·dəq), K-2778 genotipi isə bu fermentin minimal fəallığı (42±6 mkMol/mq·dəq) ilə xarakterizə olunur. Normal suvarma şəraitində qlutation-reduktazanın fəallığına görə aralıq yerləri St.Qarabağ-7 və St.Pallidum 596 genotipləri tutur.

Tədqiq edilən arpa genotiplərinin bir hissəsində su qıtlığının təsirindən qlütationreduktazanın fəallığı artmış, digərlərində isə, əksinə, azalmışdır (Şəkil 3). Su qıtlığı zamanı QR-in fəallığı üçün maksimal göstərici St.Qarabağ-7 genotipində (156±13 mkMol/mq·dəq), minimal göstərici isə St.Pallidum 596 genotipində (15±2 mkMol/mq·dəq) müşahidə edilmişdir. Quraqlıq şəraitində QR-in fəallığına görə ikinci yerdə K-2778, növbəti yerdə isə № 77 Yerli genotipi dayanır. Maraq doğuran məqamlardan biri də odur ki, bu genotiplərdə KAT üçün də eyni tendensiya müşahidə edilmişdir. Amma stres və kontrol variantlarını öz aralarında müqayisə etdikdə, bir qədər fərqli mənzərənin şahidi oluruq. Belə ki, quraqlığın təsirindən QR-in fəallığında normal suvarılan variantla müqayisədə ən yüksək artım (3 dəfədən artıq) K-2778 genotipində müşahidə edilmişdir. St.Qarabağ-7 genotipində fermentin fəallığı, təxminən 2 dəfə yüksəlmişdir. Digər iki genotipdə, quraqlığın təsirindən qlütation-reduktazanın fəallığında azalma müşahidə edilmişdir. Kontrol variantla müqayisədə arpanın № 77 Yerli genotində QR-in fəallığı stressin təsirindən az, St.Pallidum 596 genotipində isə əhəmiyyətli dərəcədə (4 dəfə) aşağı düşmüşdür.

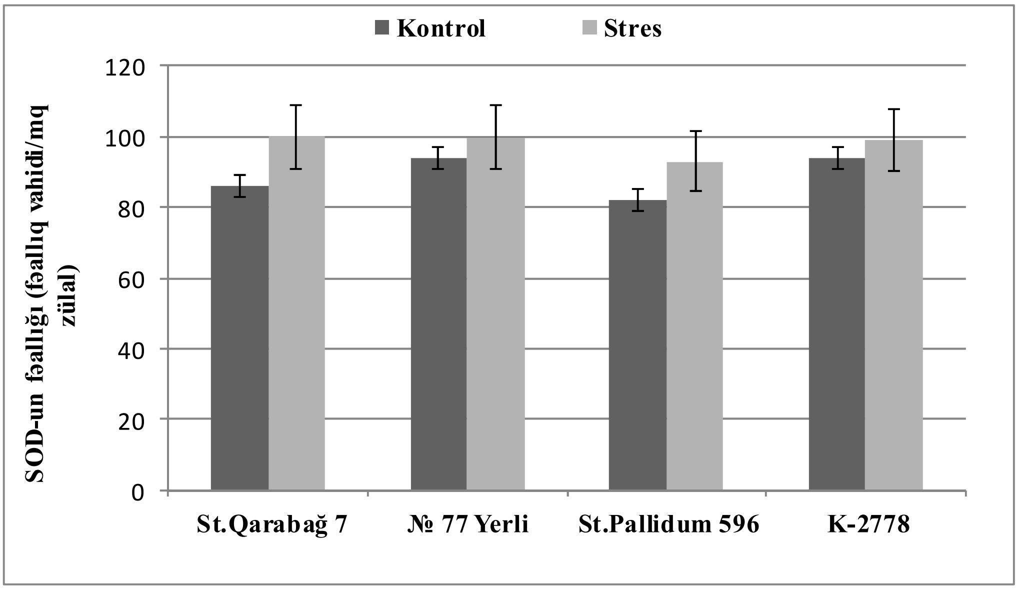
QR bitkilərdə 4 izoformaya malikdir və müxtəlif hüceyrə kompartmentləri ilə assosiasiya təşkil edir. Bu fermentin daha çox miqdarı xloroplastlarla assosiasiyada olur, lakin sitozol və mitoxondrilərdə də izozimlər aşkar edilmişdir (Romero-Puertas et al., 2006; Saruhan et al., 2009). Superoksid radikalının reduksiyası zamanı əmələ gələn hidrogen-peroksid sitoplazma, xloroplast və membranda askorbat-peroksidazanın iştirakı ilə ayrılır. Bu zaman askorbatın oksidləşməsi baş verir: $2H_2O_2$ + askorbat → dehidroaskorbat + H_2O_2 + O_2. Dehidroaskorbat reduksiya olunmuş qlutationun (QSH) iştirakı ilə askorbat-reduktazanı əmələ gətirir: 2QSH + dehidroaskorbat → QSSQ + askorbat. Oksidləşmiş qlutation (QSSQ) öz növbəsində NADFH(H^+) iştirakı ilə reduksiya olunmuş qlutationa regenerasiya olunur: QSSQ + $NADFH^+H^+$ → 2QSH + $NADFH^+$.

Superoksiddismutaza molekulyar oksigenin və hidrogen-peroksidin əmələ gəlməsi ilə gedən superoksid radikalının O_2^- dismutaza reaksiyasını kataliz edir. SOD bitkilərin oksidləşdirici stresə qarşı müdafiə sistemində ən vacib fermentlərdən biridir və bitkilərin bütün hüceyrələrində rast gəlinir (Alscher et al., 2002; Joseph and Jini, 2011).

Müxtəlif arpa genotiplərində superoksiddismutazanın fəallığına su qıtlığının təsiri də tədqiq olunmuşdur (Şəkil 4). Normal suvarılma zamanı № 77 Yerli və K-2778 genotiplərində superoksiddismutaza fermenti maksimal fəallıq göstərmişlər. Bu şəraitdə fermentinin fəllığının minimal qiyməti St.Pallidum 596 genotipində müşahidə edilmişdir (82±9 fəallıq vahidi/mq zülal).



Şəkil 3. Torpaq quraqlığı zamanı müxtəlif arpa genotiplərində qlütation-reduktaza fermentinin fəallığı.



Şəkil 4. Torpaq quraqlığı zamanı müxtəlif arpa genotiplərində superoksiddismutaza fermentinin fəallığı.

Şəkil 4-dən göründüyü kimi, tədqiq edilən arpa genotiplərində su qıtlığının təsirindən superoksiddismutazanın fəallığı artmışdır. Stres şəraitində superoksiddismutaza fermentinin fəallığı üçün maksimal göstərici St.Qarabağ-7 genotipində (100±13 fəallıq vahidi/mq zülal), minimal göstərici isə St.Pallidum 596 genotipində (93±8 fəallıq vahidi/mq zülal) müşahidə edilmişdir. Qeyd etmək maraqlı olar ki, stres zamanı qlütation-reduktaza fermenti üçün də eyni tendensiya müşahidə edilmişdir. Quraqlıq şəraitində superoksiddismutaza fermentinin fəallığına görə ikinci yeri № 77 Yerli genotipi tutur. Növbəti yer arpanın K-2778 genotipinə aiddir. Stres və kontrol variantlarını öz aralarında müqayisə etdikdə, bir az fərqli mənzərə müşahidə olunur. Belə ki, stresin təsirindən, superoksiddismutazanın fəallığında ən yüksək artım St.Qarabağ-7 genotipində müşahidə edilir. Bu genotipdə fermentin fəallığı, normal suvarılan variantla müqayisədə təxminən ~1,2 dəfə yüksəlmişdir.

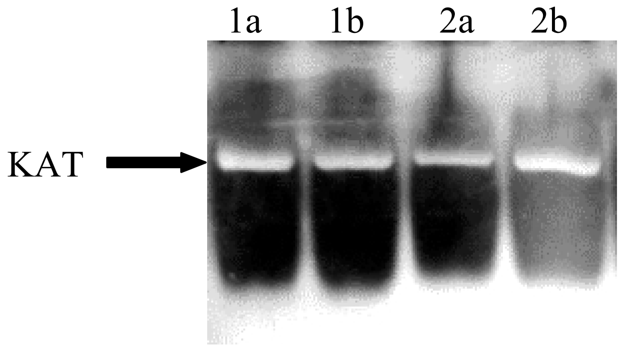
Bir çox müəlliflər tərəfindən müxtəlif stressorların təsiri zamanı SOD-un antioksidant müdafiə sistemində əsas rol oynadığı göstərilir (Raychaudhuri, 2000; Alscher et al., 2002). Bununla yanaşı, SOD-un su qıtlığına qarşı müxtəlif reaksiya göstərən müxtəlif izoformaları var. Viqna bitkisində MnSOD və FeSOD-un aktivliyi su qıtlığına cavab olaraq sürətlə artır, bu zaman Cu/ZnSOD-un aktivliyi dəyişməz qalır (Brou et al., 2007). Məlumdur ki, SOD fermenti multimer metalloproteindir və bu fermentin aktiv mərkəzində yerləşən metalın tipindən asılı olaraq müxtəlif izoformaları vardır. Ədəbiyyat mənbələrinə görə SOD-un ən geniş yayılmış izoforması aktiv mərkəzində mis-sink (Cu/Zn-SOD), manqan (Mn-SOD), dəmir (Fe-SOD) və nikel (Ni-SOD) saxlayan formalardır (Faize et al., 2011). Bitki hüceyrələrində müxtəlif stres amillərinə qarşı SOD-un induksiya olunması onun bitkinin müdafiə sistemində əsas rol oynadığını göstərir. Ümumiyyətlə, su qıtlığı zamanı superoksid radikallarını utilizə etmək üçün SOD-un fəallığı artır. Məlumdur ki, duzluluq şəratinində və digər əlverişsiz mühit amillərinin təsiri zamanı bitkidə yaranan oksidləşdirici stresə qarşı müxtəlif mexanizimlər fəaliyyət göstərir. Oksigenin oksidləşməsi SOD üçün substrat əmələ gətirməkdən əlavə, müxtəlif mexanizmlərin işə düşməsinə səbəb olur.

Beləliklə, normal suvarma və su qıtlığı şəraitlərində dörd müxtəlif arpa genotipində antioksidant müdafiə sisteminin əsas fermentlərinin tədqiqi nəticəsində aydın olmuşdur ki, quraqlıq stresinin təsirindən katalaza və superoksiddismutaza fermentlərinin fəallıqları tədqiq edilən arpa genotiplərində yüksəlmiş, askorbatperoksidaza fermentinin fəallığı isə, əksinə, su qıtlığı zamanı azalmışdır. Qlütationreduktaza fermentinin fəallığı quraqlıq stresinə cavab olaraq, St.Qarabağ-7 və K-2778 genotiplərində yüksəlmiş, № 77 Yerli və St.Pallidum 596 genotiplərində isə aşağı düşmüşdür.

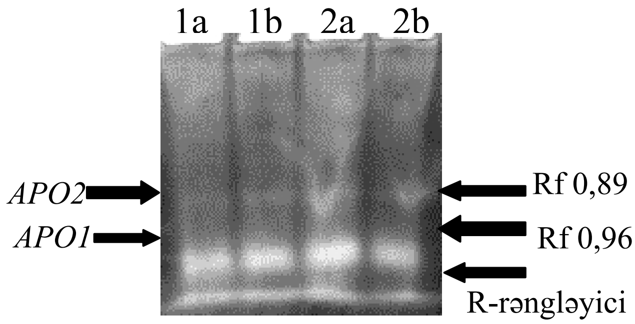
Torpaq quraqlığı şəraitində arpa genotiplərində antioksidant fermentlərin elektroforetik spektrləri də tədqiq edilmişdir (Şəkil 5). Fermentlərin elektroforetik spektrlərində nəzərə çarpacaq keyfiyyət fərqləri (elektroforeqramda əlavə xətlərin əmələ gəlməsi və ya itməsi) aşkar olunmamışdır. Lakin kontrol variantla müqayisədə stresə məruz qalmış arpa yarpaqlarının elektroforetik spektrlərində uyğun izoformaların intensivliyi artmışdır (Şəkil 5 və 6).

Şəkil 6-dan göründüyü kimi, arpa cücərtilərinin elektroforetik spektrlərində APO-nun mütəhərrikliyinə görə fərqlənən iki (Rf 0,89 və Rf 0,96),

katalazanın isə bir izoforması müşahidə olunmuşdur. Analoji nəticələr digər müəlliflər tərəfindən də alınmışdır (Kim et al., 2005; Domanskaya et al., 2009).



Şəkil 5. Torpaq quraqlığı zamanı arpa genotiplərinin yarpaqlarında katalaza fermentinin izoenzim tərkibi: 1- K-2778, 2- St. Pallidum 596; a – suvarılan, b – quraqlıq.



Şəkil 6. Torpaq quraqlığı zamanı arpa genotiplərinin yarpaqlarında askorbatperoksidaza fermentinin izoenzim tərkibi: 1 - K-2778, 2 – St.Pallidum 596 sortu; a – normal suvarma, b – quraqlıq; APO1, APO2 – fermentin uyğun izoformaları; R – rəngləyici.

Beləliklə, aparılan tədqiqatlar zamanı əldə olunan məlumatlar əsasında belə nəticəyə gəlmək olar ki, arpa genotiplərinin quraqlığa davamlılığı onların antioksidant müdafiə sistemi ilə sıx bağlıdır. Bəzi oksidləşmə stresi fermentlərinin fəallıqları ilə onların çoxsaylı izoenzimlərinin müqayisəli analizinin öyrənilməsi istiqamətində apardığımız biokimyəvi tədqiqatlar quraqlıq şəraitində arpa bitkisində bu fermentlərin fermentativ fəallıqlarını qiymətləndirməyə və bu göstəricini fizioloji və morfoloji proseslərlə əlaqələndirməyə imkan verir. Quraqlıq zamanı antioksidant fermentlərin fəallıqlarının və izoenzim tərkibinin kəmiyyət və keyfiyyət dəyişmələri arpa bitkisinin ekstremal şəraitdə öz həyati funksiyalarını və homeostazı qoruyub saxlamasını təmin edir. Aparılmış tədqiqatların nəticələri bitkilərdə quraqlığa davamlılığın qiymətləndirilməsi üçün yeni test sistemlərin yaradılmasında nəzəri əsas rolunu oynaya bilər.

ƏDƏBİYYAT

Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.,* **30(3):** 161-175.

Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. (2002) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.,* **100:** 224-233.

Amini R. (2013) Drought stress tolerance of barley (*Hordeum vulgare* L.) affected by priming with PEG. *Intl. J. Farm. and Allied Sci.,* **2(20):** 803-808.

Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.,* **55:** 373-399.

Aranjuelo I., **Molero G.**, **Erice G.**, **Avice J.C.**, **Nogués S.** (2011) Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.,* **62:** 111-123.

Ashraf M. (2010) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotech. Adv.,* **28:** 169.

Badiani M., De Biasi M.G., Colognola M., Artemi F. (1990) Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit. *Agrochimica,* **34:** 90-102.

Brou Y.C., Zeze A., Diouf O., Eyletters M. (2007) Water stress induces overexpression of superoxide dismutases that contribute to the protection of cowpea plants against oxidative stress. *African J. Biotech.,* **6 (17):** 1982-1986.

Domanskaya I.N., Budakova E.A., Samovich T.V., Spivak E.A., Shaligo N.V. (2009) Activities of the antioxidant enzymes in green seedlings of barley (Hordeum vulgare) under drought conditions. *Proceedings of the Academy of sciences of Belarus (Series of Biological Sciences),* **4:** 45-49.

Faize M., Burgos L., Faize L., Piqueras A., Nicolas E., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M.J., Alcobendas R., Artlip T., Hernandez J.A. (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *J. Exp. Bot***.,** **62(8):** 2599-613

Fayez K.A., Bazaid S.A. (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences,* **13:** 45-55.

Fu J., Huang B. (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.,* **45:** 105-114.

Joseph B., Jini D. (2011) Development of salt stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Asian J. Agric.,* **5:** 17-27.

Kim S. Y., Lim J.H., Park M.R., Kim Y.J., Park

T.I., Seo Y.W., Choi K.G., Yun S.J. (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology,* **38 (2):** 218-224.

Kumar C.N., Knowles N. (1993) Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers. *Plant Physiol.,* **102:** 115-124.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature,* **227:** 680-685.

Li Z., Shi P., Peng Y. (2013) Improved drought tolerance through drought preconditioning associated with changes in antioxidant enzyme activities, gene expression and osmoregulatory solutes accumulation in White clover (Trifolium repens L.). *Plant Omics Journal,* **6(6):** 481-489 .

Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.*, **61(15):** 4197-220

Mittler R., Zilinskas B.A. (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Ana1. Biochem.,* **212:** 540-546.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.,* **7:** 405-410.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci, 9, 1360-1385.

Najami N., Janda T., Barriah W., Kayam G., Tal M., Guy M., Volokita M. (2008) Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. *Mol. Genet. Genomics,* **279:** 171-182.

Nakano Y. and Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.,* **22:** 867-880.

Polesskaya O.G. (2007) Plant cell and reactive oxygen species. Yermakov, I.P. Ed., Moscow, 140

Raychaudhuri S.S. (2000) The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Bot. Rev.,* **66:** 89-98.

Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Sandalio L.M., Leterrier M., Rodriguez-Serrano M., Del Rio L.A. (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. New Phytol., **170:** 43-52.

Sarowar S., Kim E.N., Kim Y.J., Ok S.H., Kim K.D., Hwang B.K., Shin J.S. (2005) Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Sci.,* **169:** 55-63.

Saruhan N., Terzi N., Saglam A., Kadıoglu A. (2009) The relationship between leaf rolling and ascorbate-glutathione cycle enzymes in apoplastic and symplastic areas of Ctenanthe Setosa subjected to drought stress. *Biol. Res.,* **42:** 315-326.

Sarvajeet S.G., Narendra T. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry,* **48 (12):** 909-930.

Sedmak J.J., Grossberg S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250. *Anal. Biochem.,* **79:** 544-552.

Shaaltiel Y., Chua N.H., Gepstein S., Gressel J. (1988) Dominant pleiotropy controls enzymes co-segregating with paraquet resistance in *Conyza bonariensis*. *Theor. Appl. Genet.,* **75:** 850-856.

Shao H.B., Liang Z.S., Shao M.A., Su Q. (2005) Dynamic changes of antioxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* **42:**187-195.

Solomon S., Qin D., Manning M., Alley R.B., Berntsen T., Bindoff N.L., Chen Z., Chidthaisong A., Gregory J.M., Hegerl G.C., Heimann M., Hewitson B., Hoskins B.J., Joos F., Jouzel J., Kattsov V., Lohmann U., Matsuno T., Molina M., Nicholls N., Overpeck J., Raga G., Ramaswamy V., Ren J., Rusticucci M., Somerville R., Stocker T.F., Whetton P., Wood R.A., Wratt D. (2007) Technical Summary. In: Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M. and Miller H.L. Ed., Climate Change 2007: *The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Woodbury W., Spenser A. K., Stahmann M. A. (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Anal. Biochem.,* **41:** 301-305.

Yannarelli G.G. (2007) Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochem.,* **68:** 505-512.

Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.,* **123(1):** 223-234.

Zhang J., Kirkham M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.,* **35(5):** 785-791.

Исследование Активности и Изоферментного Состава Антиоксидантных Ферментов в Листьях Генотипов Ячменя (*Hordeum vulgare* L.), Подверженных Воздействию Засухи

И.М. Гусейнова[1], М.Я. Насруллаева[2], С.М. Рустамова[1], Д.Р. Алиева[1], Д.А. Алиев[1]

[1] *Институт ботаники НАНА*
[2] *Институт генетических ресурсов НАНА*

Засуха является одним из основных стрессовых факторов, снижающих урожайность и качество зерна растений во всем мире. Ячмень, обладая богатым генетическим разнообразием, является важным объектом для оценки ответных реакций контрастных генотипов на неблагоприятные факторы окружающей среды. Антиоксидантный метаболизм может сыграть важную роль в ответных реакциях растений на засуху. Главной целью данной работы являлось определение вариаций засухоустойчивости генотипов ячменя на основе выявленных различий в уровне антиоксидантных ферментов во время засухи. Исследованы активность и изоферментный состав антиоксидантных ферментов каталазы (КАТ), аскорбатпероксидазы (АПО), глутатионредуктазы (ГР) и супероксиддисмутазы (СОД) у 4 генотипов ячменя, подверженных почвенной засухе. При засухе у всех генотипов наблюдалось повышение активности КАТ и СОД, и в то же время снижение активности АПО. В условиях сильной засухи общая активность ГР у генотипов К 2778 и St.Карабах 7 была повышена, тогда как у генотипов №77 Local и St.Pallidum 596, наоборот, понижена. По сравнению с образцами, выращенными при нормальных условиях, при стрессе существенных различий в изоферментном составе (образование или исчезновение новых изоформ) не наблюдалось, хотя в электрофоретических спектрах была повышена интенсивность полос соответствующих изоформ.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., *засуха, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты, изоферментный состав*

Study of the Activity and Isoenzyme Composition of Antioxidant Enzymes in the leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Genotypes Subjected to Drought Stress

I.M.Huseynova[1], M.Y.Nasrullayeva[2], S.M.Rustamova[1], D.R.Aliyeva[1], J.A.Aliyev[1]

[1] *Institute of Botany, ANAS*
[2] *Institute of Genetic Resourses, ANAS*

Drought is one of the major factors limiting the yield and quality of crops worldwide. Barley characterized by high genetic diversity constitutes a valuable source for assessment of the responses of contrast genotypes to environmental constraints. Antioxidative metabolism plays an important role in plant responses to drought. The main aim of the study was to define variations in drought-tolerance of barley genotypes based on the obtained differencies in the levels of antioxidant enzymes during the drought stress. The activities and isoform profiles of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), and superoxide dismutase (SOD) were analyzed in four barley genotypes grown under soil drought. Drought stress caused an increase in the activities of CAT and SOD in all studied genotypes, while APX activity decreased. The total GR activity increased substantially in genotypes K 2778 and St.Garabag 7 and decreased in №77 local and St.Pallidum 596 genotypes under severe water stress. No detectable differences were observed in the isoenzyme composition (appearance or loss of new isoenzymes) of plants subjected to soil drought in contrast to control ones. However, the bands of corresponding isoforms in electrophoretic spectra were intensified in stressed barley leaves.

Key words: *Hordeum vulgare* L., *drought stress, reactive oxygen species, antioxidant enzymes, isoenzyme composition*